

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平11-221099

(43) 公開日 平成11年(1999) 8月17日

(51) Int.Cl.⁶

識別記号

F I

C 1 2 Q 1/70

C 1 2 Q 1/70

C 1 2 N 15/09

Z N A

C 1 2 N 15/00

Z N A A

// (C 1 2 Q 1/70

C 1 2 R 1:92)

審査請求 未請求 請求項の数 8 O L (全 5 頁)

(21) 出願番号 特願平10-28216

(22) 出願日 平成10年(1998) 2月6日

(71) 出願人 000006725

吉富製薬株式会社

大阪府大阪市中央区平野町2丁目6番9号

(72) 発明者 辻川 宗男

大阪府枚方市招提大谷2丁目25番1号 株式会社ミドリ十字内

(72) 発明者 堀井 肇

大阪府枚方市招提大谷2丁目25番1号 株式会社ミドリ十字内

(72) 発明者 森田 将典

大阪府枚方市招提大谷2丁目25番1号 株式会社ミドリ十字内

(74) 代理人 弁理士 高島 一

(54) 【発明の名称】 パルボウイルスDNAの検出方法

(57) 【要約】

【解決手段】 PCRにおいて、増幅効率が最善になるべく調整された時間、パルボウイルスDNAの熱変性処理を行うことによりDNAを増幅し、得られたDNAをELISA法により検出することからなるパルボウイルスDNAの検出方法。および、PCRにより増幅して得たDNAをELISA法により検出することからなる10コピー／反応で検出可能な高感度のパルボウイルスDNAの検出方法。

【効果】 本発明の方法により、パルボウイルスDNAを高感度に検出できる。また、クロスコンタミの危険性が少ない方法であり、比較的多数の検体を一度に調べることができる。よって、血漿や血漿を原料とする蛋白質含有製剤などのウイルス夾雑の可能性のある検体中にパルボウイルスが夾雑しているか否かを、正確に、そして簡便に調べることができ、病気の診断が容易になり、また、パルボウイルス感染事故を避けることができる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 PCRにおいて、増幅効率が最善になるべく調整された時間、パルボウイルスDNAの熱変性処理を行うことによりDNAを増幅し、得られたDNAをELISA法により検出することからなるパルボウイルスDNAの検出方法。

【請求項2】 パルボウイルスDNAがパルボウイルスB19DNAである請求項1記載の検出方法。

【請求項3】 熱変性処理が複数回行われ、一回目の熱変性処理を1分より長い時間行うことを特徴とする請求項1または2記載の検出方法。

【請求項4】 熱変性処理が複数回行われ、二回目以降の熱変性処理を1分より短い時間行うことを特徴とする請求項1～3のいずれかに記載の検出方法。

【請求項5】 熱変性処理が複数回行われ、二回目以降の熱変性処理を30秒以内で行うことを特徴とする請求項1～3のいずれかに記載の検出方法。

【請求項6】 熱変性処理が複数回行われ、二回目以降の熱変性処理を20秒以内で行うことを特徴とする請求項1～3のいずれかに記載の検出方法。

【請求項7】 熱変性処理を94℃～95℃で行う請求項1～6のいずれかに記載の検出方法。

【請求項8】 PCRにより増幅して得たDNAをELISA法により検出することからなる10コピー/反応で検出可能な高感度のパルボウイルスDNAの検出方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明はパルボウイルスDNAの検出方法に関する。

【0002】

【従来の技術】パルボウイルスB19は、伝染性紅班（リンゴ病）の病原体として知られており、本ウイルスに感染した場合、感染一週間後にウイルス血症が始まり、約5日間持続する。この時期に発熱、倦怠感等の風邪の症状が現れるが、自覚症状が出ないことも多く、この時期の感染者が血液を提供した場合、血漿中にパルボウイルスB19が混入する原因となっている。パルボウイルスB19が原因となる疾患は、伝染性紅班以外には、関節炎、貧血、血管障害、神経障害、循環器障害の関与が考えられており、妊婦の初感染において胎児水腫の例が指摘されている。

【0003】血漿を原料とする蛋白質含有製剤の安全性確保において、各種ウイルスの不活化・除去は、重要であり、種々の方法が検討されている。ところが、パルボウイルスはエンベロープをもたない直径20nmの小型のウイルスであり、熱（60℃、30分）、酸（pH3）、クロロホルム、界面活性剤に抵抗性を示す。この性質のため、パルボウイルスは、不活化・除去が比較的困難なウイルスである。よって、最終製剤中にパルボ

ウイルスが存在していないことを保証できるパルボウイルスの高感度検出方法の開発が期待されている。

【0004】PCR法（ポリメラーゼ連鎖反応法）は、DNAまたはRNAを検出する方法としてすでに広く利用されている。PCR法とは、DNA鎖の熱変性、プライマーのアニーリング、ポリメラーゼによる相補鎖の合成の繰り返しを行うことにより、*in vitro*でDNAを増幅する方法である。すなわち、①二本鎖DNAを熱変性処理により一本鎖DNAにする、②一本鎖DNAに相補的な塩基配列を有する正方向のプライマーと逆方向のプライマーをアニーリングする、③耐熱性ポリメラーゼによりプライマーから下流の鎖を伸長する、の反応を繰り返す方法である。この方法を用いると数時間で最初の量の10⁵倍以上にDNAを増幅することができる。PCR法において、PCRを二回繰り返す *nested* PCRが感度が高いと言われているが、この方法は検体間でのクロスコンタミの危険性が高いことや、PCRを二回行うために時間がかかるという欠点がある。

【0005】PCRを一回行った後、反応産物をELISA法（酵素結合抗体免疫吸着アッセイ）により検出するPCR-ELISA法が知られており、市販のキットとして、DIG（ジゴキシゲニン）標識キット（ベリンガー・マンハイム社製）およびDIG検出キット（ベリンガー・マンハイム社製）がある。この方法は、PCR反応時にDIG標識したdUTPを反応産物に取り込ませ、DIG標識されたPCR産物をアルカリ変性により一本鎖にした後、PCR産物の内部配列と相補的な配列を持つビオチン標識プローブとハイブリダイズさせる。このハイブリッドはストレプトアビジンをコートしたマイクロタイタープレートとビオチンを介して結合する。プレートに結合したDIG標識PCR産物はペルオキシダーゼでの発色反応により検出できる。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、パルボウイルスのDNAについてはパルボウイルスの高感度検出方法を提供することである。また、多くの検体を一度に検査できる当該検出方法を提供することである。

【0007】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記課題を解決すべく研究を重ねた結果、PCRにおいて、増幅効率が最善になるべく調整された時間、熱変性処理を行うことにより効率的にDNAを増幅し、得られたDNAをELISA法により検出することにより高感度にパルボウイルスDNAの検出ができることを見出した。即ち、本発明は次のものに関する。

（1）PCRにおいて、増幅効率が最善になるべく調整された時間、パルボウイルスDNAの熱変性処理を行うことによりDNAを増幅し、得られたDNAをELISA法により検出することからなるパルボウイルスDNAの検出方法。

(2) パルボウイルスDNAがパルボウイルスB19 DNAである上記(1)記載の検出方法。

(3) 熱変性処理が複数回行われ、一回目の熱変性処理を1分より長い時間行うことを特徴とする上記(1)または(2)記載の検出方法。

(4) 熱変性処理が複数回行われ、二回目以降の熱変性処理を1分より短い時間行うことを特徴とする上記

(1)～(3)いずれかに記載の検出方法。

(5) 熱変性処理が複数回行われ、二回目以降の熱変性処理を30秒以内で行うことを特徴とする上記(1)～(3)いずれかに記載の検出方法。

(6) 熱変性処理が複数回行われ、二回目以降の熱変性処理を20秒以内で行うことを特徴とする上記(1)～(3)いずれかに記載の検出方法。

(7) 熱変性処理を94℃～95℃で行う上記(1)～(6)のいずれかに記載の検出方法。

(8) PCRにより増幅して得たDNAをELISA法により検出することからなる10コピー/反応で検出可能な高感度のパルボウイルスDNAの検出方法。

【0008】本発明におけるPCRの回数は好ましくは一回である。充分に増幅させることにより、一回のPCRでも高感度に検出できる。また、検出に要する時間が短くなり多くの検体を一度に検査できる。

【0009】本発明における熱変性処理とは、90℃以上の高温に加熱することにより、相補的な塩基間の結合力を弱めて、検体中に存在する可能性のあるパルボウイルスの二本鎖DNAを一本鎖DNAにする処理、および、増幅して得た二本鎖DNAを一本鎖DNAにする処理である。この工程は、PCRに必須の工程である。熱変性処理時間が長いと一本鎖DNAへの変換が完全に行われるが、耐熱性ポリメラーゼの活性が低下し、増幅効率が低下する。逆に熱変性処理時間が短すぎると、一本鎖DNAの変換が不完全になり増幅効率が低下する。

【0010】本発明は、PCRにおいて、増幅効率が最善になるべく調整された時間、複数回熱変性処理を行う。一回目の熱変性処理の時間は、長鎖のパルボウイルスDNAを一本鎖DNAに変換するために、1分より長い時間熱変性処理をするとよい。好ましくは1分～3分、より好ましくは2分である。二回目以降の熱変性処理は、耐熱性ポリメラーゼの活性低下を考慮して、1分より短い時間が好ましい。より好ましくは30秒以内、さらに好ましくは20秒以内である。熱変性処理の温度も、一本鎖DNAへの変換と耐熱性ポリメラーゼの活性に影響する。熱変性処理の温度は、好ましくは90℃以上、さらに好ましくは90℃～95℃、特に好ましくは94℃～95℃である。好ましい時間と温度の組合せは、95℃で10秒～20秒である。

【0011】用いるプライマーは、Clewley, JP: J. Clin. Microbiol., 27, 2643-2651, 1989; Koch, WC et al.: J. Clin. Microbiol., 28, 65-69, 1990; Torok, T

J et al.: Clin. Inf. Dis. 14, 149-150, 1992 および、松永: 小児感染症 23, 99-102, 1995 などに記載されているプライマーを用いることができる。松永: 小児感染症 23, 99-102, 1995.のプライマーが好ましい。プライマーの結合は通常37℃～60℃、30秒～120秒行われる。鎖の伸長は、耐熱性ポリメラーゼの反応によるものであり、通常70℃～85℃、15秒～180秒で行われるが、72℃、30秒が好ましい。この熱変性処理、プライマーの結合・伸長の処理を15回以上、好ましくは25回～50回繰り返し、パルボウイルスDNAを増幅させる。増幅処理の最後の耐熱性ポリメラーゼ反応は、増幅産物の3'末端部位を伸長するために、時間を延長して反応させるのが好ましい。好ましい延長時間は、6分～8分である。さらに好ましくは7分である。

【0012】DNAの増幅装置は、特に限定されないが、PCR Thermal Cycler (宝酒造)、Gene Amp PCR system (Perkin Elmer)等が使用される。Gene Amp PCR system が好ましく使用される。

【0013】本発明の検出方法では、PCRにより産生したDNAを、ELISA法で検出する。本発明におけるELISA法に限定はないが、PCR産物である増幅されたDNAは、DIG、ビオチン、フルオレセイン、³²Pなどで標識されていることが好ましい。特に、DIGが好ましい。標識方法としては、特に制限はないが、好ましくは、標識したヌクレオチドをDNAの伸長時に取り込ませることにより標識する。

【0014】また、本発明におけるELISA法として、例えば、PCR産物の二本鎖DNAを一本鎖にしてから、標識プローブを結合させ、その標識によりマイクロプレートに固定してから検出する方法が挙げられる。この方法において、二本鎖DNAを一本鎖DNAにするには、アルカリ変性処理、加熱急冷などの変性処理をすればよい。プローブの標識には、ビオチン、DIG、ジニトロフェニル、フルオレセインが好ましく、特にビオチンが好ましい。

【0015】例えば、ビオチン標識プローブを用いた場合、ビオチン標識プローブが結合したPCR産物DNAは、ストレプトアビジンをコートしたマイクロプレートに、ビオチンを介して固定される。このときの温度は、37℃～60℃、好ましくは40℃～55℃、特に55℃が好ましい。時間は、1時間～20時間であるが、1時間処理で問題はなく、検出時間を短縮したいときは、1時間が好ましい。

【0016】マイクロプレートに固定されたPCR産物DNAの検出は、DNAが標識済のものであれば、その標識を検出することにより行う。たとえば、DIG標識DNAであれば、POD (ペルオキシダーゼ) 標識抗DIG抗体を添加して、吸光度を測定することによりDNAを検出できる。

【0017】本発明の検出方法で検出するパルボウイルスDNAは限定されないが、パルボウイルスB19DNAの検出に好適である。

【0018】本発明はPCRにより増幅して得たDNAをELISA法により検出することからなる10コピー／反応で検出可能な高感度のパルボウイルスDNAの検出方法である。10コピー／反応で検出可能とは、PCRに供するパルボウイルスDNAの量が10コピー存在すれば検出可能ということである。

【0019】

【実施例】以下に本発明をより詳細に説明するために実施例および実験例を示すが、本発明はこれらにより何ら限定されるものではない。

【0020】実験例1

パルボウイルスB19DNAのコピー数が既知の試料を用いて、希釈系列(1000コピー／チューブ、100

試料	50 μ l
10倍濃度PCR緩衝液	10 μ l
PCR DIG標識用混合物	10 μ l
プライマーB1 (2.50 μ M)	10 μ l
プライマーB2 (2.50 μ M)	10 μ l
Taq DNAポリメラーゼ (5U/ μ l)	0.5 μ l
水	9.5 μ l
	100 μ l

【0022】PCR用溶液を95℃、2分間インキュベートし、パルボウイルスB19DNAを一本鎖DNAにした後、95℃、15秒、60℃、30秒、72℃、30秒を40サイクル行うことでDNAを増幅した。72℃、7分間インキュベートして、3'末端を伸長した後、4℃に冷却した。

【0023】PCR産物をアルカリ変性により一本鎖にした後、ビオチン標識プローブを含むハイブリダイゼーション溶液を加えストレプトアビジンをコートしたマイクロプレートに分注した。55℃で1時間インキュベートし、PCR産物をマイクロプレートにビオチンを介して結合した。洗浄後、POD標識抗DIG抗体を添加し、37℃、30分間インキュベートし、洗浄後、ABTS (2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline 6-sulfonic acid)基質溶液を添加し、37℃30分間インキュベートし、405nmの吸光度を測定した。結果を表1に示す。

【0024】

【表1】

コピー／チューブ、10コピー／チューブ、1コピー／チューブ)をつくり、検出感度を調べた。対照は、パルボウイルスB19DNAを含まない試料とした。プライマーおよびプローブは次のものを用いた。

プライマーB1 5'-CAAAAGCATGTGGAGTGAGG-3'
 プライマーB2 5'-GTGCTGT CAGTAACCTGTAC-3'
 DIG ラベルプローブ 5'-TAGCTGCCACAATGCCAGTGGAAGGAGGC-3'

PCR法では、DIG標識dUTPを含むdNTPを用いて、PCR産物をDIG標識した。試薬は、DIG標識キット(ベーリンガーマンハイム製)を用いた。ELISA法では、DIG検出キット(ベーリンガーマンハイム製)の試薬を用いた。

【0021】次の試薬を混合して、PCR用溶液100 μ lを200 μ lマイクロチューブに調製した。

試料 (コピー／反応)	吸光度
0 (対照)	0.026
1	0.022
10	0.482
100	0.854
1000	1.262

【0025】10コピー／反応以上で陽性であった。

【0026】実験例2

実験例1で得られたPCR産物を6%PAGE(ポリアクリルアミドゲル電気泳動)後、臭化エチジウムで染色したところ、1000コピー／反応の試料でバンドが検出されたが、100コピー／反応の試料および10コピー／反応の試料では、バンドが検出されなかった。

【0027】実施例1

パルボウイルスB19陽性血漿の10段階までの10倍希釈系列を作成した。これらのうち、8、9、10段階の希釈系列の検体各々100 μ lからDNAをスマイテストEx-R&D(住友金属製)により抽出した。すなわち酵素溶液15 μ l、共沈剤溶液5 μ l、検体希釈液480 μ lに検体100 μ lを添加し、55℃、30分間インキュベートし、さらに蛋白溶解液400 μ lを添加し、55℃、15分間インキュベート後、イソプロパノール800 μ lを添加して、氷中に15分以上放置した。15000rpm、20分間遠心し、上清を廃棄し

た後、70%エタノール500 μ lで2回洗浄し、沈殿を10分間風乾後、滅菌水に溶解して、実験例1の方法によりパルボウイルスB19DNAの検出を行った。二重測定で2回試験を行った結果を表2に示す。これらの結果から、低い希釈倍率が陽性で、高い希釈倍率が陰性という関係が得られた。また、試験1と試験2で結果に著しい乖離はなく、本法は検体間のクロスコンタミが少なく、再現性の高い方法であった。

【0028】

【表2】

希釈倍率	試験1	試験2
10 ⁶	+ / +	+ / +
10 ⁹	- / -	+ / -
10 ¹⁰	- / -	- / -

【0029】実施例2

試料として、人血清アルブミン（ミドリ十字製）を用いた。試薬、プライマー、プローブは実験例1と同様のもの

のを用い、実験例1と同様の方法で、パルボウイルスB19のDNAを検出したが、パルボウイルス19のDNAは検出されなかった。

【0030】

【発明の効果】本発明の方法により、パルボウイルスDNAを高感度に検出できる。本発明の方法は増幅効率がよいために、1反応あたり、パルボウイルスDNAが10コピーあれば検出可能である。本方法は、PCR産物を臭化エチジウムで検出する方法に比較して、2桁感度が高いものである。また、本発明の方法はクロスコンタミの危険性が少ない方法である。さらに、比較的検出に要する時間が短時間であり、簡便な方法であるから、多数の検体を一度に調べることができる方法である。よって、血漿や血漿を原料とする蛋白質含有製剤中などのウイルス夾雑の可能性のある検体中にパルボウイルスが夾雑しているか否かを、正確に、そして簡便に調べることができ、病気の診断が容易になり、また、パルボウイルス感染事故を避けることができる。